

## 二酵素固定化膜における酵素分布の効果について

功 刀 滋\* 中 島 貴 也\* 野 村 哲 士\*

Effect of Enzyme Distributions in Membranes

Carrying Two Immobilized Enzymes

Catalyzing Sequential Reactions

Shigeru KUNUGI, Takaya NAKAJIMA, and Akihiko NOMURA

(Received Feb. 28, 1990)

Properties of enzyme membranes carrying two enzymes which catalyze two sequential reactions are investigated by numerical calculations with special references to the effect of distributions of two enzymes within the membrane matrix for essential two types of systems; (a) permeating membrane systems which corresponds to the (enzyme) membrane reactors separating the substrate supplying side and the product collecting side, (b) reflecting membrane system corresponding to enzyme electrodes or supported enzyme film in a batch-wise reactor.

### 1. はじめに

酵素を高分子支持体に固定化することは様々に利用されてきた技術であるが<sup>1)</sup>、中でも平面状、膜状の固定化酵素と電極系とを組み合わせた酵素電極はセンサーなどとして、広い範囲で利用されている。<sup>2)</sup>

さらに最近では二種類の酵素を用いて異なる反応をカップリングさせる固定化酵素やマイクロバセルの試みもいくつか報告されている。<sup>3)</sup> このような場合には複数の酵素の固定化膜内での空間配置、基質、反応物の空間的分布といったことが系の性能に大きく関わってくる。この種の問題は生体膜そのものあるいは生体膜モデルにおける(階層的)構造化の問題としても重要視されているが、本論文では酵素を固定した高分子マトリクスを透過型(連続プロセス)、または反射型(パッ

---

\* 生物化学工学科

チブプロセス)のリアクターとして用いようとした際にマトリクス中の複数の酵素の分布がその性質にどの様に影響するかを、計算により検討する。

具体的には、包括固定化法などで二種の酵素を固定化した膜状のものを想定する。これはタンパク質の巨大な分子を”ジャングルジム”状のマトリクスの中に閉じ込めるようにして固定するものであるが、高分子マトリクス中に閉じ込められた酵素が触媒作用を発揮するためには、基質や、必要な場合には補欠因子(補酵素)がバルク中から酵素が固定されている位置まで到達できなければならないので特に拡散が酵素反応とともに重要な因子となる。

筆者らは既に酵素を非対称に固定した膜状の固定化酵素で仕切られた二つの槽で別々の酵素反応を進行させようという”膜透過型”のリアクターを想定した実験を行い、酵素膜中の酵素の分布を通じて基質と生成物の挙動を制御する問題を提起した。<sup>4)</sup>

## 2. モデル

この種の問題を単一の酵素系について理論的に扱い酵素膜中での基質及び生成物の挙動を計算によりシミュレートした例がC i f l c i らにより報告されている。<sup>5)</sup> 本論文ではこれを参考に二つの酵素が固定された場合について拡張し、その際酵素の分布にいくつかのパターンを考え計算を行う。

C i f l c i らは酵素の可逆反応



において、固定化膜中の基質、生成物の拡散を含めた計算式を次式のようにおいた。

$$D_s \cdot \frac{d^2 S_x}{dx^2} = V_m \cdot \frac{S_x - a \cdot P_x}{K_m + S_x + b P_x} \quad (2)$$

$$D_p \cdot \frac{d^2 P_x}{dx^2} = -V_m \cdot \frac{S_x - a \cdot P_x}{K_m + S_x + b P_x} \quad (3)$$

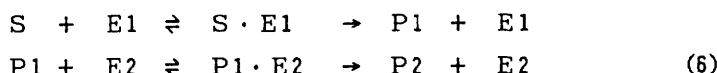
ここで、 $V_m$ は $[E] \cdot k_3$ 、 $K_m$ は $(k_2 + k_3)/k_1$ 、 $a$ は $k_2 \cdot k_4/k_1/k_3$ 、 $b$ は $k_4/k_1$ である。これらの式では、生成物阻害( $k_4$ 、逆反応)が含まれ複雑であるが、正反応のみ( $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$ のみ)の簡略なモデルで(連立型の差分近似102分画で)次式によって予備的に数値計算したところ、透過型の境界条件(膜の左端の基質濃度は一定( $S_1$ )、右端の基質濃度と両側の生成物濃度( $S_{102}$ 、 $P_1$ 、 $P_{102}$ )は0に保たれるものとする)の下ではC i f l c i らとほぼ同じ結果が得られた。

$$D_s \cdot \frac{d^2 S_x}{dx^2} = V_m \cdot \frac{S_x}{K_m} \quad (4)$$

$$D_p \cdot \frac{d^2 P_x}{dx^2} = -V_m \cdot \frac{S_x}{K_m} \quad (5)$$

(ここでも $V_m = [E] \cdot k_3$ 、 $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$ )

すなわち、逆反応の存在はこの様な濃度プロフィールをもたらす主要因ではないことがわかったので、ここでの二酵素系では、次の式による反応を想定した。



従ってS、P1およびP2の濃度の計算は、

$$D_s \cdot \frac{d^2 S_x}{dx^2} = V_m \cdot \frac{S_x}{K_m} \quad (7)$$

$$D_{p1} \cdot \frac{d^2 P1_x}{dx^2} = -V_m \cdot \frac{S_x}{K_m} + V_m' \cdot \frac{P1_x}{K_m'} \quad (8)$$

$$D_{p2} \cdot \frac{d^2 P2_x}{dx^2} = -V_m \cdot \frac{P1_x}{K_m} \quad (9)$$

ここで、 $V_m$ 、 $K_m$ はE1の $V_m'$ 、 $K_m'$ はE2についての上と同様のパラメーターである。これらの式から、連立差分方程式を逐次解くことにより、それぞれの濃度プロファイルデータを得た。また、マトリクス中の酵素の分布パターンを種々に変えた場合や、二酵素系の場合に二つの酵素の力価を変えた場合の特性を評価する際には、 $V_m$ 、 $V_m'$ にそれぞれの分布状態や力価に応じたパラメーターを掛け合わせて計算を行った。

この場合酵素膜中における酵素の分布は図1に示すように、

Type I マトリックス中に酵素が均一に固定されているもの。

Type II 左半分と右半分が別々の、張り合わせ型固定化マトリックス。

Type III IIの右と左を逆にしたもの。

Type IV マトリックス中の酵素分布が、膜厚方向に直線的に変化していくもの。

Type V IVにおいて分布を左右逆にしたもの。

Type VI マトリックス中の酵素分布が、膜厚方向に指数的に変化していくもの。

Type VII VIにおいて分布を左右逆にしたもの。

の七つのパターンを想定した。

それぞれの場合に対して、膜をはさむ二つの槽の左側を基質槽S、右側を生成物槽として、左側から右側への透過型固定化酵素膜系と固定化マトリックスの右側が（例えば電極等により）閉鎖されている反射型固定化酵素系を考え、また酵素1と2の活性比を1:1、1:3、3:1にしたものを検討した。S、P1、P2の拡散定数 $D_s$ 、 $D_p$ は他報との比較のためにすべて $5.7 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ とし、酵素の $K_m$ は $400 \mu\text{M}$ 、 $V_m$ は標準で $1.5 \mu\text{M}/\text{s}$ 、膜厚Lは $0.017 \text{ cm}$ と仮定した。

### 3. 結果と考察

このような膜の評価の尺度としては、基質、生成物濃度の膜内の両境界における傾き、即ちそれぞれの物質の単位時間当りの流出量が適しているであろう。つまり $S_s$ （基質SのS槽からの流入）にたいして $S_p$ （未反応基質SのP槽への流出）と $P_s$ （生成物P（P1、P2）のS槽への流出）が小さく $P_p$ （生成物P（P1、P2）のP槽への流出）が大きい方が良いと考えられる。

図2は透過型反応系において、膜内のS、P1、P2の濃度プロファイルを図示したものである。また表1は種々の場合について $P2_p$ 、 $P1_p$ 、 $P2_s$ 、 $P1_s$ 、 $S_s$ 、 $S_p$ を評価した結果である。

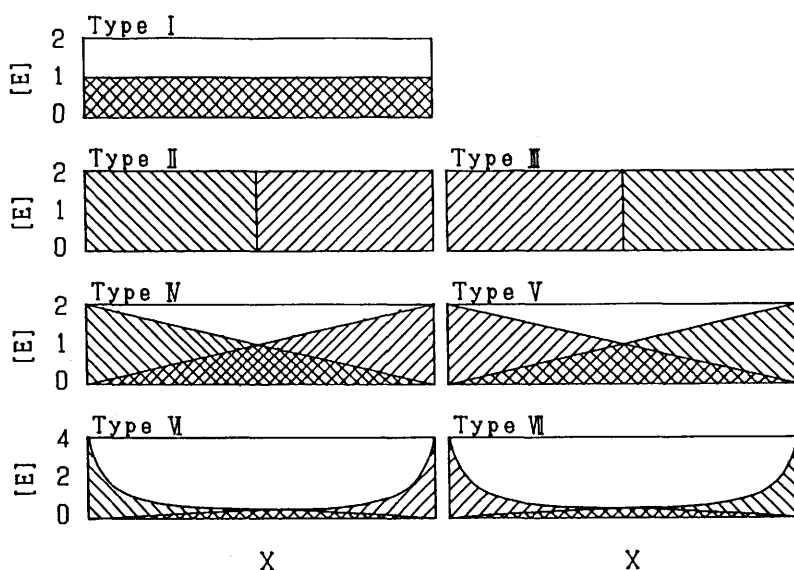


Fig.1. Enzyme distribution patterns considered in this paper for membrane carrying two enzymes catalyzing sequence reactions.  
 \\\ and //// indicate E1 and E2, respectively.

これらのうち「 $P_{2p}/S_s$ 」( $P_p/S_s$ )は膜内に入ったSの中で、生成物に転換されP槽へ回収される割合を、「 $S_p/S_s$ 」は膜内に入ったSの中で未反応の基質がP槽にリークする割合を、「 $P_{2s}/S_s$ 」( $P_s/S_s$ )はSの流入量当りのPのP槽への逆流を示している。単純には「 $P_p/S_s$ 」が反応効率を最もよく表しているパラメーターであると考えられるので、この数値がより大きいものが目的に適しているといえるであろう。また「 $S_p/S_s$ 」、「 $P_s/S_s$ 」はいずれも反応の進行にとってはロスなので、これらはより小さい数値であることが望まれる。

二酵素固定化系で酵素活性比を変えたそれぞれの条件で、これらの要求のすべてを満たすタイプはない。即ち、「 $P_{2p}/S_s$ 」については、どの条件でもType V、VII、IIIなどが大きい値をとっているが、「 $S_p/S_s$ 」、「 $P_{2s}/S_s$ 」では、Type IV、VI、Type II、VIがそれぞれ値が小さく、反応のロスが少ないといえる。Type V、VII、IIIについて $P_{2p}$ の値を見るとあまり数値が高くないにもかかわらず、「 $P_{2p}/S_s$ 」が良い値を示しているのは、 $S_s$ が他と比べて小さいためである。これは、この三つの中では、マトリックスのS槽に面した部分にはE1はほとんど存在しておらず、界面におけるSの取り込みはその拡散のみに頼っているためであろう。この $S_s$ が小さい(Sの取り込みが少ない)ことは系全体の反応進行が遅いことであるから、(拡散との比較において)この酵素膜自体の基質転換効率が悪いことになる。事実これらは、濃度プロフィールを見ても $P_1$ 、 $P_2$ 濃度は低くなっている。

逆にType VIでは、S槽界面におけるE1濃度が他のタイプよりも高いために、マトリックス中に入ったSが速やかに消費されSの流入速度が大きくなることにより、「 $S_p/S_s$ 」、「 $P_{2s}/S_s$ 」が低い数値を示している。このType VI、あるいはType II、IVは、 $P_{2p}$ もある程度高い

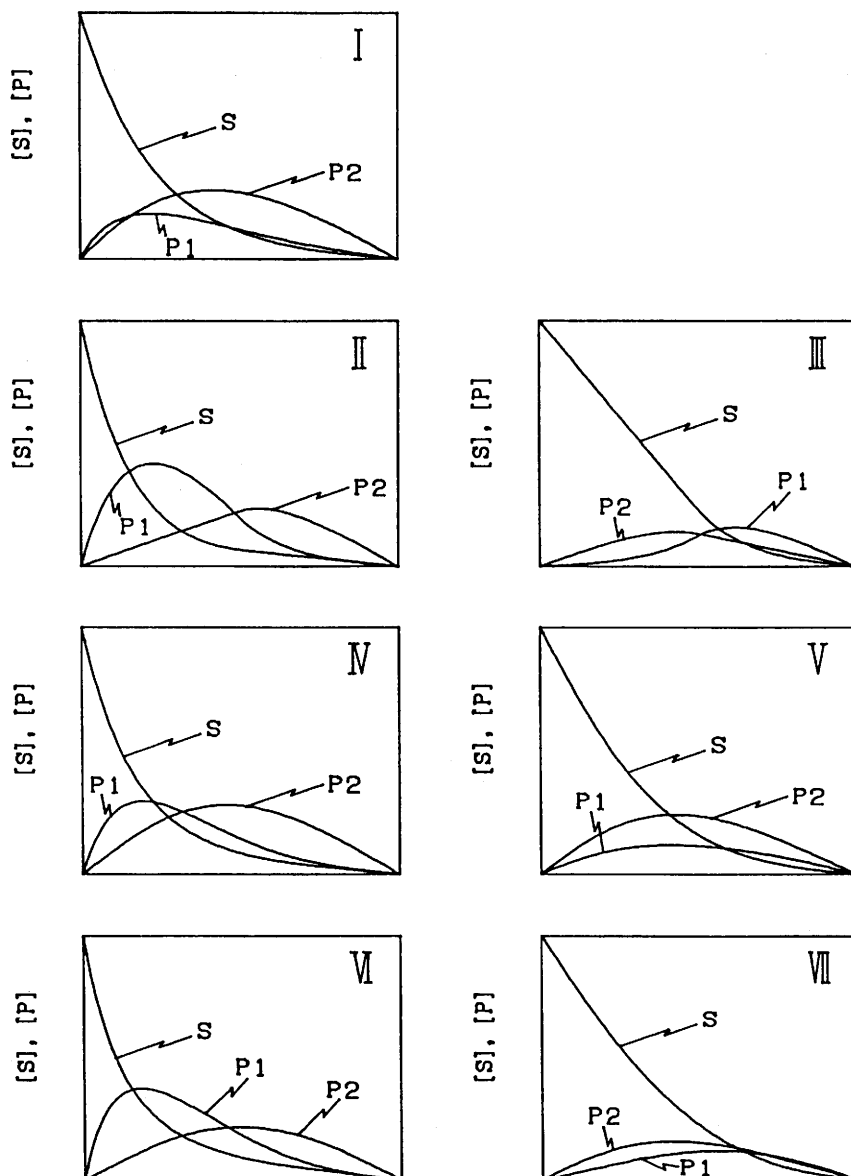


Fig.2. Concentration profile of S, P1, and P2 in the permeating enzyme membrane carrying two enzymes catalyzing sequential reactions. Roman numbers correspond the distribution patterns in Fig.1.

数値を示しており、この反応系に比較的適しているといえる。またP1のマトリックス外への流出を見ると、E2活性の方がE1の活性より高いIVが一番少なく反応のロスが少ないと言える。

一方図3は、反射型、つまり物質がマトリックスを通過せず、元の槽に戻る場合の濃度プロフィールを示したものである。これらは一つの槽でバッチ的な処理を行うものと考えれば良い。

Table 1. Properties of asymmetric two-enzyme membranes when used in a permeating system

Type	E1/E2	Ss	Sp	P1s	P1p	P2s	P2p	P2p/Ss	Sp/Ss	P2s/Ss
I	1	42.7	1.12	20.8	1.87	11.9	7.01	0.164	0.026	0.278
II	1	59.7	1.35	45.1	1.17	4.52	7.48	0.125	0.023	0.076
III	1	15.2	1.35	0.71	5.91	4.52	2.74	0.180	0.089	0.297
IV	1	57.0	1.16	37.6	1.29	9.40	7.55	0.133	0.020	0.165
V	1	24.5	1.16	5.12	3.13	9.40	5.70	0.233	0.047	0.383
VI	1	73.7	1.58	57.0	1.44	6.66	6.98	0.095	0.021	0.090
VII	1	19.4	1.58	2.71	4.66	6.66	3.76	0.194	0.081	0.344
I	1/3	32.7	2.42	11.5	1.02	11.1	6.56	0.201	0.074	0.341
II	1/3	45.4	2.64	30.9	0.396	4.54	6.96	0.153	0.058	0.100
III	1/3	14.2	2.64	0.23	4.77	3.96	2.59	0.182	0.186	0.279
IV	1/3	42.9	2.47	23.3	0.511	9.53	7.02	0.164	0.058	0.222
V	1/3	20.5	2.47	2.31	2.15	8.16	5.38	0.263	0.121	0.399
VI	1/3	53.8	3.06	36.8	0.511	7.01	6.43	0.119	0.057	0.130
VII	1/3	16.6	3.06	1.06	3.39	5.55	3.55	0.214	0.184	0.334
I	3	55.8	0.37	34.6	3.07	11.1	6.56	0.118	0.007	0.200
II	3	77.9	0.54	63.9	2.50	3.96	6.96	0.089	0.007	0.051
III	3	16.2	0.54	1.63	6.88	4.54	2.59	0.160	0.033	0.281
IV	3	75.2	0.40	57.0	2.58	8.16	7.02	0.093	0.005	0.109
V	3	29.4	0.40	9.90	4.22	9.53	5.38	0.183	0.014	0.324
VI	3	99.4	0.61	83.8	2.96	5.55	6.43	0.065	0.006	0.056
VII	3	22.8	0.61	5.77	5.83	7.01	3.55	0.156	0.027	0.308

従ってこの場合の評価は、いかにSをP2まで高効率で転換し得るかということになるので、「P2/S」の数値をもって評価することができる。また「P2/S」と「P1/S」の差( $\Delta P_i/S$ )が大きいものほどP1の流出による反応ロスが少ないことになる。

各条件での計算値を表2に示す。「P2/S」では、III、VIIが大きく、その中で $\Delta P_i/S$ の項が高いのはE2の活性を高くしたものであり、バッチ的な反応プロセスにおいてS→P2への高い転換効率が期待できる。

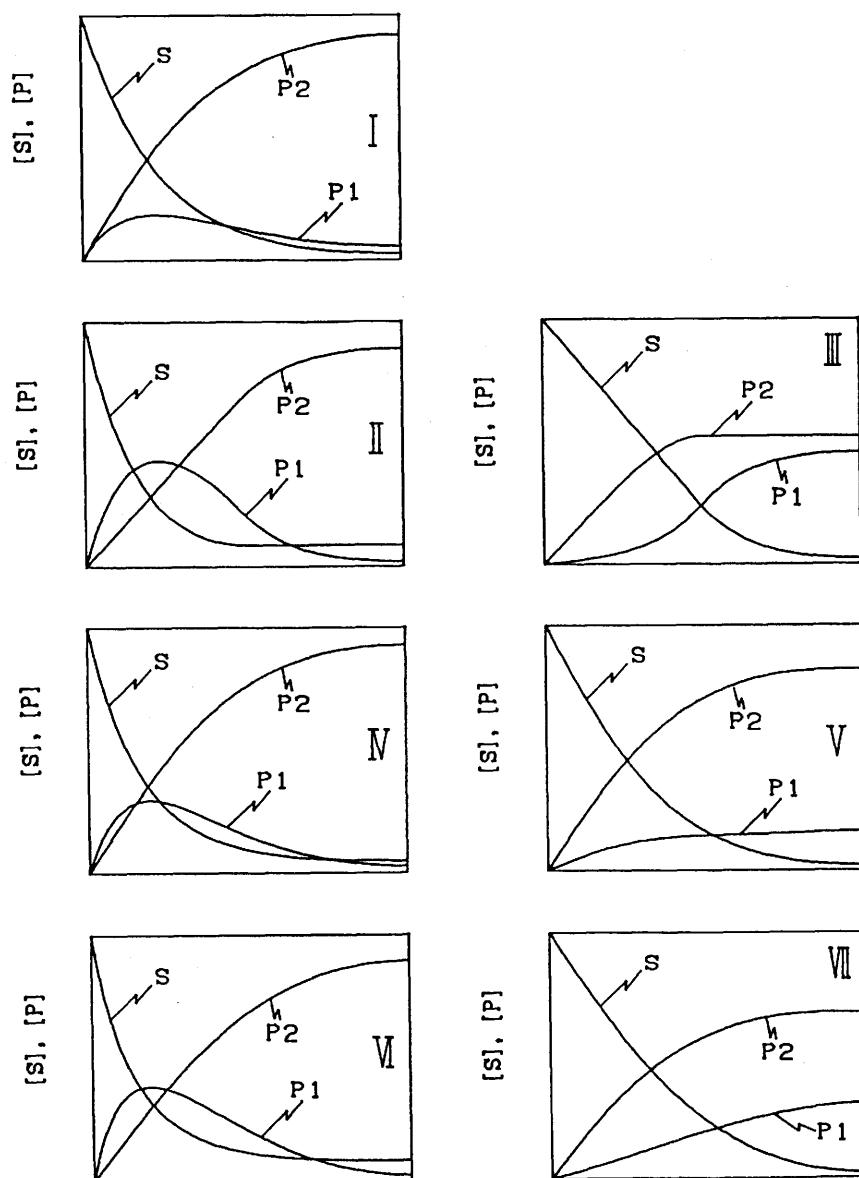


Fig.3. Concentration profile of S, P1 and P2 in the reflecting enzyme membrane carrying two enzymes catalyzing sequential reactions. Roman numbers correspond the distribution patterns in Fig.1.

このように、二酵素系の固定化酵素反応において透過型の連続プロセスのみならず、バッチプロセスにおいても、酵素が均一に固定されているものよりある分布を持っている方が転換効率が高いという結果は非常に興味深い。今後は、補酵素共役系のようなより複雑な（現実に近い）対象を取り上げるとともに、いくつかの実現可能な系での実験的検証が待たれる。

Table 2. Properties of asymmetric two-enzyme membrane when used in a reflecting system

Type	E1/E2	S	P 1	P 2	P 1 / S	P 2 / S	$\Delta P i / S$
I	1	42.7	20.9	21.7	0.491	0.509	0.019
II	1	59.6	45.7	13.8	0.767	0.233	-0.535
III	1	15.2	1.35	13.8	0.089	0.911	0.822
IV	1	56.9	37.7	19.2	0.663	0.337	-0.326
V	1	24.5	5.33	19.1	0.218	0.783	0.565
VI	1	73.5	57.4	16.1	0.781	0.219	-0.562
VII	1	19.3	3.22	16.1	0.167	0.833	0.667
<hr/>							
I	1/3	32.5	11.6	20.9	0.358	0.642	0.284
II	1/3	44.9	31.8	13.2	0.707	0.293	-0.414
III	1/3	14.0	0.467	13.6	0.033	0.967	0.933
IV	1/3	42.6	23.6	19.0	0.554	0.446	-0.108
V	1/3	20.3	2.39	17.9	0.117	0.882	0.765
VI	1/3	53.3	37.5	15.8	0.703	0.297	-0.406
VII	1/3	16.4	1.24	15.2	0.075	0.924	0.849
<hr/>							
I	3	55.8	34.9	20.9	0.626	0.374	-0.252
II	3	77.9	64.3	13.6	0.826	0.174	-0.652
III	3	16.2	3.01	13.2	0.186	0.814	0.627
IV	3	75.2	57.2	17.9	0.761	0.239	-0.523
V	3	29.4	10.5	19.0	0.355	0.645	0.289
VI	3	99.4	84.2	15.2	0.847	0.153	-0.694
VII	3	22.8	6.96	15.8	0.306	0.694	0.389

## 引用文献

- 1) 例えば 千畑一郎 編 "固定化生体触媒" 講談社サイエンティフィク (1986)
- 2) 例えば 鈴木周一 編 "バイオセンサー" 講談社サイエンティフィク (1984)
- 3) 例えば H.K.Chenault and G.M.Whitesides, App.Biochem.Biotech.,14,147(1987)
- 4) S.Kunugi,H.Yamada,T.Nakajima and Y.Nakamura, Membrane,12,101-105 (1987)
- 5) T.Ciftci and W.R.Vieth, J.Mol.Catalysis, 8,455-464 (1980)